Nachweis von Cholecystokinin like Aktivität im menschlichen Gehirn

Rolf Wolharn

Düsseldorf 1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535716_0051

Aus der II. Medizinischen Klinik D
der Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. med. G. Strohmeyer

Nachweis von Cholecystokinin like Aktivität im menschlichen Gehirn

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin.
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Rolf Wolharn

1982

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf.

Der Dekan
gez: Prof. Dr. G. Arnold

Referent
gez: Prof. Dr. W.-P. Fritsch
Korreferent
gez: Prof. Dr. med. M. Berger

Inhaltsangabe:

1. Einleitung und Fragestellung
2. Methodik
2.1. Prinzip des Radioimmunoassays
2.2. Radioaktive Markierung von Gastrin I mit ^{125}Jod
2.3. Chromatographische Trennung von Gastrin-^{125}Jod und ^{125}Jodid
2.4. Aufbewahrung der Gastrin-^{125}Jod-Fraktionen
2.5. Überprüfung der Markierung
2.6. Herstellung des Gastrin-Antikörpers
2.7. Gewinnung und Aufbereitung der Hirnproben
2.8. Stimulationsversuche beim Menschen zur Serum-CCK-8-Bestimmung mit Olivenöl und einer Biloptin-Reizmahlzeit
2.9. Gewinnung von Liquor, portalem und peripheren Serum zur CCK-8-Bestimmung beim Hund
2.1o. Testbedingungen zur CCK-8-Bestimmung in wässrigen Hirnextrakten und in Liquor
2.11. Testbedingung zur CCK-8-Bestimmung im Serum
2.12. Kreuzreaktionen des benutzten Antikörpers
2.13. Einfluß von Heparin auf den Eichkurvenverlauf
2.14. Einfluß verschiedener Mengen von verfallenem Frisch - plasma (BBP) auf den Eichkurvenverlauf
2.15. Eichkurvenverlauf bei verschiedenen Eiweißen in der Pufferlösung
2.16. Trennung von antikörpergebundenem und freiem Hormon
2.17. Messung der Radioaktivität
2.18. Identifikation der CCK-8-ähnlichen Substanzen in wässrigen Hirnproben durch Stärkegelelektrophorese
2.19. Säulenchromatographie der wässrigen Extrakte von Hirnproben
2.2o. Überprüfung der Genauigkeit
3. Ergebnisse
3.1. Einfluß von Heparin auf den Eichkurvenverlauf
3.2. Einfluß unterschiedlicher Mengen von verfallenem Frischplasma (BBP) auf den Eichkurvenverlauf

3.3. Eichkurvenverlauf bei verschiedenen Eiweißen in der Pufferlösung
3.4. Empfindlichkeit des CCK-8-Assays und Reproduzierbarkeit
3.5. Kreuzreaktionen mit Gastrin, gastrinähnlichen Hormonen und Hormonbruchstücken
3.6. Säulenchromatographie der wässrigen Hirnextrakte
3.7. Stärkegelelektrophorese der wässrigen Hirnex - trakte
3.8. CCK-8-Konzentration im menschlichen Serum nach Stimulation mit Olivenöl und Biloptin-Reizmahlzeit
3.9. CCK-8-Konzentration im portalen und peripheren Hundeserum bei Olivenölstimulation
3.1o. CCK-8-Konzentration im Hundeliquor
3.11. CCK-8-Konzentrationen in den wässrigen Extrakten verschiedener Hirnregionen
4. Diskussion
4.1. Methodische Probleme des Radioimmunoassays
4.2. Konzentration und Verteilung einer CCK-8-ähnlichen Substanz im menschlichen Gehirn
4.3. CCK-8-Konzentrationen im menschlichen und im Hundeserum
4.4. Neuere Erkenntnisse über biologische Aktivitäten des CCKs

5. Zusammenfassung

6. Literaturverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung

Es gibt Peptide, die sowohl im Gastrointestinaltrakt wie auch im Gehirn vorkommen. Eiweiße, die ursprünglich allein im Gehirn und in den peripheren Nervenzellen lokalisiert wurden, finden sich durch neuere Untersuchungsmethoden auch im Intestinaltrakt und umgekehrt. EULER und GADDUM fanden 1931 ein Peptid in alkoholischen Extrakten von Pferdehirn und Darm (12). 40 Jahre später konnten CHANG und LEEMAN (6) mit Hilfe eines Radioimmunoassays das Peptid isolieren und seine Struktur aufklären. Sie fanden das Peptid, welches sie Substance P nannten, in hohen Konzentrationen in der Sub - stantia nigra und im Hypothalamus. Durch weitgehendere Unter - suchungen konnten PEARSE, POLLAK und HEITZ (1976/77) Sub - stance P in enterochromaffinen Zellen (EC I) des Gastrointesti- naltraktes und des Gallengangs finden (37).

Weitere Peptide wie Somatostatin, Neurotensin und Enkephalin konnten nach ihrer Entdeckung im Gehirn auch im Magen-Darm-Trakt nachgewiesen werden. Gastrin, CCK und VIP konnten durch radioimmunologische Untersuchungen nicht nur im Magen und Dünndarm, sondern auch im Gehirn lokalisiert werden.
IVY und OLDBERG beschrieben (1928) die Stimulation der Gallen- blase durch eine Substanz, der sie den Namen Cholecystokinin gaben (23). Sie legten dar, daß es sich um einen hormonalen Mechanismus handelt, der zur Kontraktion und Entleerung der Gallenblase führt.

HARPER und RAPER (1943) berichteten über die Sekretion von Pankreasenzymen durch Pankreozymin (19).

JORPES (1968) konnte die Annahme, daß es sich hier um zwei verschiedene Hormone handele, durch die Aufklärung der Struktur von CCK-PZ widerlegen (24). Die verschiedenen Wirkungen werden heute einem Hormon zugeschrieben. Nach GROSSMANN wird das Hormon nach seiner zuerst beschriebenen Wirkung Cholecystokinin

UNIV. LEIDEN BIBL.

benannt.

CCK scheint von den Mukosazellen des oberen Dünndarmdrittels (45) freigesetzt zu werden (45,21,29,56). Starke Stimuli für die Freisetzung von CCK stellen Fette, Aminosäuren und der saure Magensaft dar. Nach Freisetzung von CCK erfolgt eine Gallenblasenkontraktion und eine Enzymstimulation des Pankreas.

Cholecystokinin ist ein Polypeptid aus 33 Aminosäuren. Die 5 letzten Aminosäuren des C-terminalen Endes von CCK sind gleich mit denen des Gastrins und denen des Caeruleins (11). Caerulein ist ein Peptid, das in der Haut des Frosches Hyla caerulea gefunden wurde (11).

Aminosäurensequenz von Gastrin I, Cholecystokinin und Caerulein

Gastrin I

Glu-Gly-Pro-Try-Leu-Glu (5)-Ala-Tyr-Gly- Try-Met-Asp-Phe (NH_2)

Cholecystokinin

C-terminales Ende Asp-Tyr(SO_3)-Met-Gly- Try-Met-Asp-Phe (NH_2)

Caerulein

Glu-Gln-Asp-Tyr(SO_3)-Thr-Gly- Try-Met-Asp-Phe (NH_2)

Durch die Ähnlichkeit in der Aminosäurensequenz werden die gastrointestinalen Hormone CCK und Gastrin in die Gastringruppe eingeordnet. Die weiteren GI-Hormone wie Glukagon, Motilin, VIP, GIP und Sekretin werden in der Sekretingruppe zusammen - gefaßt. Bei der Sekretingruppe stehen viele Aminosäuren an identischen Positionen, und alle Substanzen haben einen Über - schuß an basischen Aminosäuren. Für ihre volle biologische Aktivität ist die Präsenz der gesamten Aminosäurensequenz

erforderlich (24,26).

Die biologische Aktivität von CCK ist in hohem Maße davon abhängig, daß der Tyrosinrest an der 7. Stelle vom C-terminalen Ende aus gezählt sulfatiert ist. An der Aktivität von Gastrin, das an 6. Stelle (vom C-terminalen Ende aus gezählt) einen Tyrosinrest hat, ändert eine Sulfatierung nichts. Beide Formen kommen als Gastrin I und Gastrin II natürlicherweise vor. Bei beiden Hormonen bewirkt eine Abspaltung des C-terminalen Amids eine völlige Aufhebung ihrer Wirkungen (5).

Das C-terminale Oktapeptid vom Schweine-CCK konnte synthetisch hergestellt werden. ANASTASI konnte nachweisen, daß dieses Oktapeptid des CCKs die physiologischen Wirkungen des gesamten Schweine-CCK-Moleküls besaß.

VANDERHAEGEN beschrieb eine gastrinähnliche Substanz im Gehirn verschiedener Tierspezies (52). DOCKRAY (8) und MÜLLER (33) et al zeigten, daß es sich hierbei wahrscheinlich um das C-terminale Oktapeptid des CCK handelt (31,32,8). Durch Verwendung verschiedener Antiseren gegen Schweine-CCK und durch verschiedene Trennmethoden konnte im Schweinegehirn sowohl CCK wie auch CCK-8 nachgewiesen werden (MÜLLER).

Ziel dieser Arbeit ist es, Versuchsbedingungen für einen Radioimmunoassay auszutesten, der eine hohe Kreuzreaktion für das C-terminale Ende der Hormone der Gastringruppe zeigt. Anhand dieser Methode wurde die anatomische Verteilung einer dem CCK-Oktapeptid-ähnlichen Substanz im menschlichen Gehirn untersucht.

Weiterhin sollte die Konzentration dieser Substanz im menschlichen Blut nachgewiesen werden.

Zur Klärung der Frage, ob eine Konzentrationsänderung der Substanz bei der Leberpassage erfolgt, wurden zwei Hundeversuche durchgeführt.

2. Methodik

2.1. Prinzip des Radioimmunoassays

Heute ist es möglich, Enzyme, Schilddrüsenhormone, Steroidhormone, Vitamine, Nukleotide und andere Substanzen im Plasma oder anderen Körperflüssigkeiten durch radio - immunologische Methoden zu bestimmen (4,2o,15,54,5o,53). Der erste Radioimmunoassay wurde für das Hormon Insulin Ende der Fünfzigerjahre von BERSON und YALOW beschrieben (3). Der RIA hat gegenüber anderen Untersuchungsmethoden den Vorteil einer ausgezeichneten Empfindlichkeit und einer hohen Spezifität. Durch die Spezifität von immunologischen Reaktionen ist es möglich, exakte Bestimmungen von Sub - stanzen zu machen, obwohl eine weitaus höhere Konzentration von zum Teil chemisch-ähnlichen Substanzen in einer zu unter - suchenden Probe vorhanden ist. Diese Bestimmungen sind möglich, ohne vorher die Untersuchungsproben zu reinigen. Das Prinzip des RIA besteht darin, daß eine reversible Bindung eines markierten Antigens, z.B. Hormon, zu seinem spezifischen Antikörper besteht und daß ein nicht markiertes Antigen die Fähigkeit hat, mit dieser Reaktion zu konkurrieren und das markierte Antigen von seinem Platz zu verdrängen. Mit Erhöhung der Hormonkonzentration wird bei konstanter Antikörpermenge und konstanter Menge des markierten Hormons der prozentuale Anteil des antikörpergebundenen, markierten Hormons durch Verdrängung abnehmen.

Unter Testbedingungen wird das Antiserum soweit verdünnt, daß nur 30 - 60 Prozent des radioaktiv-markierten Hormons gebunden wird. Beim Zufügen von nicht markiertem Antigen wird sich durch kompetitive Hemmung die Bindung von markiertem Antigen reduzieren in der Form, daß freie Hormonmengen eine starke Verdrängung der markierten Hormone bewirken.

Bei Verwendung abnehmender Konzentrationen läßt sich oberer Zusammenhang in Form einer Eichkurve beschreiben. Unbekannte Proben werden in derselben Pufferlösung bestimmt und haben die gleiche Konzentration von Antikörpern und markiertem Antigen wie sie in der Standardkurve vorgegeben sind.

Sie werden gleichzeitig und unter gleichen Bedingungen inkubiert wie der Standard. Zur Verwahrung gleicher Inkubati - onsbedingungen müssen die Pufferlösungen von Standard und Probe gleiche Zusammensetzung haben.

Die Hormonkonzentration der unbekannten Probe ergibt sich aus der Abnahme der Bindung des markierten Hormons in der Probe durch Vergleich mit der Eichkurve. Zur graphischen Darstellung der Eichkurve werden auf der Abszisse als unabhängige Variable die Hormonkonzentrationen und auf die Ordinate die abhängige Variable aufgetragen. Für die abhängige Variable sind mehrere mathematische Ausdrucksweisen möglich. Es kann verwandt werden z.B. der Prozentsatz der Radioaktivität die an den Antikörpern bei einer abfallenden Hormonmenge gebunden ist oder das Verhältnis (B/F) der Radioaktivität, die an den Antigen - Antikörperkomplex gebunden ist (B) zur Radioaktivität die ungebunden (F) ist.

Graphisch läßt sich bei Gültigkeit des Massenwirkungsgesetzes der Reaktionsablauf wie folgt darstellen:

$$\overset{\times}{Ag} + AK \quad \overset{\times}{Ag}AK$$
$$(F) \qquad (B)$$
$$+$$
$$Ag$$

$$AgAK$$

$\overset{\times}{Ag}$ markiertes Antigen
AG nicht markiertes Antigen
AK Antikörper

Die Empfindlichkeit eines RIAs hängt unter anderem im wesentlichen von Affinitätskonstanten des benutzten Anti - serums ab. Eine hohe Affinitätskonstante äußert sich bei der Verwendung einer graphischen Darstellung der Eichkurve mit B/F als abhängige Variable in einem steilen Verlauf der Eichkurve. Zur Trennung von freien und antikörper - gebundenem markierten Hormon wird nach Zugabe eines Adsorbens z.B. Holzkohle oder Kunstharz die Inkubationslösung aufge - schüttelt und anschließend zentrifugiert. Nach Dekantierung wird die Aktivität von Sediment und Überstand gemessen. Die Zählrate im Überstand entspricht der Aktivität des anti - körpergebundenen markierten Hormons, während das Sediment die Aktivität des freien markierten Hormons repräsentiert.

2.2. Radioaktive Markierung von Gastrin I mit ^{125}Jod

GREENWOOD und HUNTER beschreiben ein Markierungsverfahren, das sich durch eine hohe spezifische Aktivität auszeichnet (22,57). An den Tyrosinrest in Pos. 12 des Gastrinmoleküls läßt sich radioaktives Jodid einbauen. ^{125}Jodid wird durch ein Oxydationsmittel zu ^{125}Jod oxydiert. ^{125}Jod, das nicht an den Tyrosinrest angelagert wurde, wird am Ende der Reaktion durch ein Reduktionsmittel wieder zu ^{125}Jodid reduziert (51). Übrigbleibendes freies Jodid wird anschließend durch ein Trennverfahren vom radioaktiv markierten Hormon abgetrennt. Durch dieses Verfahren läßt sich ein Hormon mit einer hohen Radioaktivität herstellen. Die Radio - aktivität allein, ausgedrückt durch die Zählrate im Scintillationsmesser, gibt Aufschluß über die radioimmunologischen Reaktionen im RIA.

Reagenzien:

1. 1 mCi $Na^{125}J$ (Behring-Werke Best.-Nr. 5006)
2. Chloramin T (Merck, Darmstadt Best.-Nr. 2426)
3. Natriumdisulfit (Merck, Darmstadt Best.-Nr. 6528)
4. NaH_2PO_4 $2H_2O$ (Merck, Darmstadt Best.-Nr. 6580)
5. Na_2HPO_4 H_2O (Merck, Darmstadt Best.-Nr. 6346)
6. Gastrin I (1-17) (Imperial Chemical Industries)
   gelöst in H_2O-Konzentration: 250 ng/microliter

Lösungen:

I. 0,25 m Natriumphosphatpuffer pH 7,5
II. Oxydationslösung: 52,5 mg Chloramin T/10 ml 0,25 m Natriumphosphatpuffer pH 7,5
III. Reduktionslösung: 48 mg Natriumdisulfit / 10 ml 0,25 m Natriumphosphatpuffer pH 7,5
IV. Elutionspuffer: 0,02 m Veronalpuffer pH 8,7
0,1 g% Human-Serum-Albumin

Arbeitsweise:

Das Gefäß mit $Na^{125}J$ wird bei 5000 U/Min. zentrifugiert, so daß sich die radioaktive Flüssigkeit in der Bodenspitze des Gefäßes absetzt.

Anschließend werden mit Hilfe von Einmalpipetten (Fa. Brand) schnell hinzugegeben:

20 Microliter 0,25 m Natriumphosphatpuffer pH 7,5
4 Microliter Gastrin (1-17)
10 Microliter Oxydationslösung
20 Microliter Reduktionslösung

Diese Reaktionslösung wird mit 1 ml Elutionspuffer aufgefüllt.

2.3. Chromatographische Trennung von Gastrin-^{125}Jod und ^{125}Jodid

Prinzip:

Durch Gelchromatographie lassen sich unter anderem Eiweiße mit verschiedenen Molekulargrößen trennen (35,1,17). Die Trennung kommt dadurch zustande, daß Moleküle, die größer sind als die Poren des Gels, nicht in die Gelperlen eindringen und somit die Gelsäule schneller verlassen, als kleine Moleküle, die in die Gelperlen eindringen und dadurch längere Zeit benötigen, um die Gelsäule zu durchlaufen. Zur Trennung von Gastrin-^{125}-Jod und ^{125}Jodid läßt sich aufgrund der unterschiedlichen Molekulargewichte der beiden Substanzen die Gelchromatographie benutzen. Bei der Trennung wird der Geltyp Sephadex G-50 fine (Pharmacia, Uppsala / Schweden) verwendet. Bei dem Gel handelt es sich um Dextran. Bei dem Sephadex G-50 fine-Gel liegt die Ausschlußgrenze für Teilchen mit einem Molekulargewicht von 1500. Gastrin-^{125}Jod wird bei K_{av}=0,4 eluiert. ^{125}Jodid verläßt wegen seines geringen Molekulargewichtes nach einem Volumen die Säule, welches dem Gesamtvolumen der Säule entspricht (V_T).

Vorbereitung der Säule:

Gequollenes Sephadex G-50 fine-Gel wird blasenfrei in eine Säule (Hirschmann EM) eingefüllt. Das Volumen der Säule beträgt 50 ml. Über 24 Stunden wird anschließend die Säule mit 0,02 m Veronalpuffer, 0,1 g% BSA pH 8,7 im Kühlraum bei 4^{0}C gewaschen.

Chromatographie:

Nach Beendigung der radioaktiven Markierung des Gastrins wird das Auftragsvolumen mittels einer Pipette auf das Gel in der Säule gegeben. Sofort nach dem Einsinken des Markierungsvolumens in das Gel wird ein Elutionspuffer - spiegel (0,02 m Veronalpuffer, 0,1 g% BSA pH 8,7) über der Gelsäule eingestellt. Das obere Säulenrohr wird durch einen Schlauch dicht verschlossen, der an eine Flasche mit einem Elutionspuffer angeschlossen ist. Die Elutions - geschwindigkeit beträgt 0,25 ml/Minute. Durch einen automatischen Fraktionssammler (LKB Fraction Collector 7000) werden 60 Fraktionen mit einem Volumen von je 1 ml gesammelt. Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wird mit einem automatischen Gamma-Zähler (LKB Gamma-Counter) gemessen.

2.4. Aufbewahrung der Gastrin-^{125}Jod-Fraktionen

Nach der Messung der einzelnen Fraktionen im Gamma-Counter werden diejenigen Fraktionen mit hohen Zählraten in der Kühltruhe bei -20^{o} bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.5. Überprüfung der Markierung

Zur Überprüfung der immunologischen Eigenschaften der aus - gewählten Fraktionen wird das Bindungsvermögen von Gastrin-^{125} Jod an den Antikörper getestet. Es werden Antikörperverdünnungen von 1:25 000 und 1:50 000 eingesetzt. Ebenfalls wird die Bindung von Gastrin-^{125}Jod an das verwendete Adsorbens (Holzkohle) überprüft. Das Inkubationsvolumen beträgt 2,5 ml. Die Aktivität pro Röhrchen beträgt 1oo Counts/Min. Die Inkubationszeit dauert 6 Tage.

2.6. Herstellung des Gastrin-Antikörpers

Aufgrund des niedrigen Molekulargewichts von Gastrin ist bei der Injektion in chemisch reiner Form nur eine geringe Antikörperproduktion beim Tier zu erwarten. Zur Erreichung einer stärkeren antigenen Eigenschaft wird das Hormon an ein größeres Trägermolekül gekoppelt (18,54,41). Nach der Methode von McGuigan erfolgt eine Kopplung des Gastrin 14-17 (Research Plu USA) an Rinderserumalbumin. Als Kopplungs - reagenz dient ein Carbodiimidderivat. Um die Antikörper - produktion noch weiter zu steigern, wird zusätzlich Freund'sches Reagenz verwendet (16,14).

Arbeitsweise:

In ein Reagenzröhrchen werden gegeben:

20 mg Gastrin (14-17) gelöst in 1 ml 20% N, N Dimethylformamidlösung
100 mg BSA in 1,5 ml Phosphatpuffer pH 7,5
10 mg 1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid in 0,2 ml destilliertem Wasser

Der Röhrcheninhalt wird über 12 Stunden durch einen Magnet - rührer bei 20°C gemischt. Anschließend wird das an Rinder - serumalbumin gekoppelte Gastrin und vollständiges Freund'sches Adjuvans im Verhältnis 1:1 solange vermengt, bis eine viskose Emulsion entsteht.

4 Kaninchen erhalten in unregelmäßigen Abständen subcutane Injektionen der antigenen Emulsion in die Oberschenkelinnen - seite. Die injizierte Emulsion hat eine Antigenmenge von 2 mg Gastrin 14-17. Wöchentlich nach der Immunisierung wird Blut aus der Ohrvene entnommen, zentrifugiert und das Serum bei -20°C aufbewahrt.

2.7. Gewinnung und Aufbereitung der Hirnproben

Aus 22 verschiedenen definierten Hirnabschnitten werden Proben entnommen und mit Hilfe von Trockeneis tiefgefroren. Anschließend werden kleiner Gewebsproben mit einem Skalpell vom Untersuchungsmaterial abgetrennt und mit einer Analysenwaage (Mettler) gewogen. Im Verhältnis 1:10 (g Gewebsprobe/ml H_2O) wird den Proben destilliertes Wasser zugefügt. Die so aufbereiteten Proben werden im Wasserbad 5 Minuten gekocht und anschließend durch einen Teflongrinder homogenisiert. Danach wird das Material 30 Minuten bei 1500 g zentrifugiert. Der wässrige Überstand wird mit einer Pasteur-Pipette abpipettiert und in der Kühltruhe bei -20°C bis zum Einsatz in den Assay aufbewahrt.

2.8. Stimulationsversuche beim Menschen zur Serum-CCK-8-Bestimmung mit Olivenöl und einer Biloptin-Reizmahlzeit

Dem Probanden wird nach vierzehnstündiger Nahrungskarenz unter Röntgenkontrolle eine Duodenalsonde in den oberen Anteil des Duodenums gelegt. Durch eine Braunüle in einer Unterarmvene werden dem Probanden zweimal 10 ml Blut zur CCK-8-Basalwertbestimmung abgenommen. Der Konus der 10 ml Einmalspritzen (Braun-Melsungen) wird vorher mit einer Heparinlösung (1 ml 500 USP-E.Heparin, Hoffmann La Roche) gefüllt. Nach Gabe von 1oo ml Olivenöl ins Duodenum werden 10 ml Blutproben nach 5 Minuten, 15 Minuten, 25 Minuten, 35 Minuten, 45 Minuten, 60 Minuten und 90 Minuten abgenommen. Die Proben werden sofort 3 Minuten lang bei 3500 U/Min. zentrifugiert. Das abpepettierte Serum wird bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Beim Stimulationsversuch mit Biloptin (Schering AG,Bergkamen) wird die Reizmahlzeit peroral aufgenommen. Es gelten die gleichen Bedingungen wie beim Stimulationsversuch mit Olivenöl.

2.9. Gewinnung von Liquor, portalem und peripherem Serum zur CCK-8-Bestimmung beim Hund

Während einer Inactin-Kurznarkose werden 2, ca. 25 kg schwere Hunde, intubiert. Zur Fortführung wird eine Beatmungsnarkose mit Halothan angewendet. Nach Eröffnen der Bauchhöhle wird die Vena portae freipräpariert, eine Braunüle eingeführt und fixiert. Die Lage der peroral geschobenen Duodenalsonde im oberen Duodenum wird durch Palpation gesichert.

Nach Anlegen eines Venenkatheters in die Femoralvene werden gleichzeitig 5 ml Blutproben aus der peripheren Vene und aus der Vena portae zur Basalbestimmung der CCK-8-Konzen - tration abgenommen. Der Konus der 5 ml Einmalspritze ist mit einer Heparinlösung (1 ml - 500 USP-E.Heparin) gefüllt. Nach Instillation von 200 ml Olivenöl gleichzeitige Abnahme von peripherem und portalem Blut nach 2, 5, 10, 15 und 20 Minuten. Das Abnahmevolumen beträgt jeweils 5 ml. Die Blut - proben werden sofort 3 Minuten lang bei 3500 U/Minute zentrifugiert. Das abpipettierte Serum wird bis zur weiteren Verwendung bei -20^{o}C eingefroren.

Zeitlich unabhängig von den Blutentnahmen werden insgesamt 3 ml Liquor durch Suboccipital-Punktion gewonnen.

2.1o. Testbedingungen zur CCK-8-Bestimmung in wässrigen Hirnmassen und im Liquor

Lösungen:

I 0,02 m Veronalpuffer pH 8,7
0,1 g% BSA (Bovine Albumin Powder, Sigma Chemical)

II ^{125}J Gastrin I (1000 Counts/Min./Röhrchen)

III CCK-8 (synthetisches CCK-8, Squibb-Chemicals)
Standardlösungen:

a)	2 pg/0,1 ml
b)	5 pg/0,1 ml
C)	10 pg/0,1 ml
d)	25 pg/0,1 ml
e)	50 pg/0,1 ml
f)	100 pg/0,1 ml

IV CCK-8-Antiserum 1:40 000 verdünnt

V wässriges Hirnextrakt

VI Liquor

Arbeitsweise:

Zur Erstellung der Eichkurve werden eingesetzt pro Teströhrchen:

Tracer-Kontrolle	2,5 ml I und II
Bestimmung des O-Wertes	2,5 ml I, II und IV

Kennzeichen der Konkurrenz von nicht markiertem und markiertem Antigen zum Antikörper:

2,4 ml I, II, IIIa und IV
2,4 ml I, II, IIIb und IV
2,4 ml I, II, IIIc und IV
2,4 ml I, II, IIId und IV
2,4 ml I, II, IIIe und IV
2,4 ml I, II, IIIf und IV

Zur Hormonbestimmung pro Teströhrechen (Polystyrolröhrchen, Greiner & Söhne) werden eingesetzt:

wässrige Hirnextrakte:

2,49 ml I, II, IV und 0,01 ml V
2,45 ml I, II, IV und 0,05 ml V
2,4o ml I, II, IV und 0,1o ml V
2,3o ml I, II, IV und 0,2o ml V

Liquor:

2,3 ml I, II, IV und 0,2 ml VI

Die Inkubationszeit des Assays beträgt 6 Tage. Die Proben werden während der Inkubationszeit im Kühlschrank bei $4^{o}C$ aufbewahrt.

2.11. Testbedingung zur CCK-8-Bestimmung im Serum

I 0,02 m Veronal-Puffer pH 8,7 0,1 g% BSA

II ^{125}J Gastrin I (1000 Counts/Min./Röhrchen)

III CCK-8 Standardlösungen: a) 2 pg/0,1 ml
b) 5 pg/0,1 ml

c) 10 pg/0,1 ml
d) 25 pg/0,1 ml
e) 50 pg/0,1 ml
f) 100 pg/0,1 ml

IV CCK-8 Antiserum 1:40 000

V durch Holzkohle gereinigtes BBP (verfallenes Frischplasm

VI Serumproben

Arbeitsweise:

Zur Erstellung der Eichkurve werden eingesetzt pro Teströhrchen:

Tracer-Kontrolle	2,5 ml I,II,V
Bestimmung des 0-Wertes	2,5 ml I,II,IV,V

Kennzeichen der Konkurrenz von nicht markiertem und markiertem Antigen zum Antikörper:

2,2 ml I, II, IIIa, IV und 0,2 ml VI
2,2 ml I, II, IIIb, IV und 0,2 ml VI
2,2 ml I, II, IIIc, IV und 0,2 ml VI
2,2 ml I, II, IIId, IV und 0,2 ml VI
2,2 ml I, II, IIIe, IV und 0,2 ml VI
2,2 ml I, II, IIIf, IV und 0,2 ml VI

Zur Hormonbestimmung in den Serumproben werden pro Teströhrchen eingesetzt:

2,3 ml I, II, IV und 0,2 ml VI.

2.12. Kreuzreaktionen des benutzten Antikörpers

Zur Kennzeichnung der unterschiedlichen Kreuzreaktionen des benutzten Antikörpers werden Testansätze unter gleichen Bedingungen wie bei der CCK-8-Bestimmung in wässrigen Hirn - extrakten mit Gastrin, gastrinähnlichen Hormonen und Hormonbruchstücken hergestellt.

Die verschiedenen Antigene sind:

Gastrin	1 - 17	(Imperial Chemical Industries)
Gastrin	11 - 17	(Imperial Chemical Industries)
Gastrin	14 - 17	(Vega Vox Chemicals)
CCK		(Karolinska-Institut)
CCK-8 (unsulfatiert)		(Research Plus, USA)
CCK-8 (sulfatiert)		(Squibb Chemicals)
Caerulein		(Beachem / Schweiz)

2.13. Einfluß von Heparin auf den Eichkurvenverlauf

Eine mögliche Einflußnahme auf die Immunreaktion durch das bei der Blutentnahme verwendete Heparin wird durch Einsatz unterschiedlicher Heparinkonzentrationen in den Testansätzen zur Erstellung von Eichkurven geklärt.

Neben Testansätzen ohne Heparin werden 20, 40, 60 USP Heparin / 2,5 ml Inkubationsvolumen gegeben. Es gelten ansonsten die gleichen Bedingungen wie zur CCK-8-Bestimmung im Serum.

2.14. Einfluß verschiedener Mengen von verfallenem Frisch - plasma (BBP) auf den Eichkurvenverlauf

Zur Bestimmung des Eichkurvenverlaufs werden Testansätze mit 0,1 ml, 0,2 ml und 0,3 ml BBP / 2,5 ml Inkubationsvolumen hergestellt. Als Vergleich wird ein Testansatz mit BBP-freiem Inkubationsvolumen benutzt. Testbedingungen und Arbeitsweise sind wie bei der Erstellung einer Eichkurve zur CCK-8-Bestimmung im Serum.

2.15. Eichkurvenverlauf bei verschiedenen Eiweißen in der Pufferlösung

Zur Kennzeichnung einer Änderung des Eichkurvenverlaufs bei Gabe verschiedener Eiweiße in die Pufferlösung werden Testansätze mit

HSA (Behring-Werke AG) 0,1 g% 0,02 m Veronal-Puffer pH 8,7
BSA (Sigma Chemicals) 0,1 g% 0,02 m Veronal-Puffer pH 8,7
Ovalbumin (Sigma Chemicals) 1 g% 0,02 m Veronal-Puffer pH 8
hergestellt.

Testbedingungen und Arbeitsweise sind wie bei der CCK-8-Bestimmung im Serum.

2.16. Trennung von antikörpergebundenem und freiem Hormon

Prinzip:

Nach Beendigung der immunologischen Reaktion wird antikörper - gebundenes und freies Hormon voneinander getrennt. Als Adsorbens für das freie Hormon wird Holzkohle gewählt. Das antikörpergebundene, nicht an das Adsorbens gebundene Hormon verbleibt im Überstand (54,55).

Arbeitsweise:

Nach der Inkubationszeit werden in jedes Röhrchen 100 Micriliter Holzkohle (Norit A 10 g%, Serva Feinbiochemica, Heidelberg) gegeben. Der Röhrcheninhalt wird anschließend kurz mit einem Vortex durchgemischt. Danach erfolgt die Zentrifugation in der Kühlzentrifuge bei $4^{o}C$ und 2500 g über 15 Minuten. Das Sediment wird vom Überstand durch Dekantierung getrennt. Der Überstand enthält das antikörper-gebundene Hormon (B), und im Sediment befindet sich das freie Hormon (F) .

2.17. Messung der Radioaktivität

Zur Erstellung der Eichkurve und zur Bestimmung der CCK-8-Konzentration der Hirnproben, wird die Radioaktivität im Überstand und im Sediment gemessen. Als Meßgerät wird ein Gamma-Zähler (LKB 8000 Gamma Sample Counter) mit automa - tischem Probenwechsler benutzt. Der Prozentsatz von freiem zu antikörpergebundenem Hormon wird mit einem Programm im Tischrechner (LKB) errechnet. Anhand dieser Werte wird die Eichkurve erstellt und der Hormongehalt der unbekannten Proben ermittelt.

2.18. Identifikation der CCK-8-ähnlichen Substanzen in wässrigen Hirnproben durch Stärkegelelektrophorese

Aufgrund unterschiedlicher Ladungen und Molekülgrößen der Peptide ist es möglich, Hormone durch ihre unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten im elektrischen Feld zu unterscheiden. Als Trägermaterial wird Stärkegel benutzt. Als Spannungsquelle dient ein Gleichspannungsgenerator (Pharmacia Fine Chemicals EPS 500/400). Die Potentialdifferenz zwischen Anode und Kathode beträgt 80 V Gleichspannung. Die Stärkegelelektrophorese wird 14 Stunden im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Zur Charakterisierung der unbekannten Proben werden als Marker Bromphenolblau und bromphenolblau - gefärbtes Albumin ebenfalls auf den Stärkegelblock aufgetragen. Nach Beendigung der Stärkegelelektrophorese erfolgt die Auftrennung des Stärkegelblocks in 12 Segmente von je 1 cm Länge. Anschließend Einfrieren der Segmente über 6 Stunden bei -18°C. Nach dem Auftauen werden die jeweiligen Segmente mit einem Standardpuffer (0,02 m Veronal-Puffer 0,1 g% Rinderserumalbumin) durchtränkt und anschließend ausgedrückt. Das in Polystrolröhrchen aufgefangene Eluat wird 15 Minuten bei 2500 g zentrifugiert. Danach Dekantieren des klaren Überstandes und Untersuchung von Eluatanteilen im RIA. Zum Vergleich des Wanderungsverhaltens der CCK-8-ähnlichen Substanz wird eine Stärkegelelektrophorese des sulfatierten und nicht-sulfatierten CCK-Oktapeptids (Squibb Research Plus USA), des Gastrin 1 - 17 (ICI) und des Gastrins 14 - 17 (Research Plus USA) durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgt unter den gleichen Bedingungen wie die Elektrophorese der wässrigen Hirnsubstanzen.

2.19. Säulenchromatographie der wässrigen Extrakte von Hirnprobe

Eiweißgemische lassen sich durch die unterschiedlichen Molekulargewichte der einzelnen Peptide durch Gelchromatographie

voneinander trennen.

Bei der angewendeten Säulenchromatographie wird das Sephadex G-50 Fine Gel (Pharmacia Fine Chemicals / Uppsala) gewählt. Der Fraktionierbereich bei Sephadex G-5o Fine liegt bei Peptiden zwischen einem Molekularge - wicht von 1500 - 30000. Das in destilliertem Wasser gequollene Gel wird blasenfrei in die Säule eingefüllt und über 24 Stunden mit einem Standardpuffer (0,02 m Veronal-Puffer 0,1 g% Rinderserumalbumin) äquilibriert. Als Säule dient eine Hirschmann EM-Säule mit einem Volumen von 60 ml. 40 bzw. 100 Microliter des wässrigen Hirnextraktes werden mittels einer Pasteurpipette auf das Gel gebracht. Der Standardpuffer wird als Elutions - mittel verwendet. Nach Herstellung eines Standardpuffer - spiegels über der Gel-Säule wird die Durchflußgeschwindigkeit von 15 ml/Std. eingestellt. Die einzelnen Fraktionen werden durch einen automatischen Fraktionssammler (LKB Fraction Collector) gesammelt. Das Fraktionsvolumen beträgt 17 Tropfen, was 1 ml entspricht. Zur Kennzeichnung des Ausschlußvolumens wird Dextran Blau (Pharmacie Fine) oder ^{131}-Albumin benutzt. Zur Kennzeichnung des gesamten Säulenvolumens wird ^{125}-Jod verwendet. Eine weitergehende Kalibrierung der Säule erfolgt mit ^{125}-Jod-Gastrin. Zusätzlich wird zur Bestimmung des Ausschlußvolumens, repräsentiert durch Dextran-Blau, eine photometrische Messung (Photometer Eppendorf) bei einer Wellenlänge von 436 nm durchgeführt. Die gewonnenen Fraktionsvolumina werden sofort in den RIA eingesetzt. Anschließend wird bei gleichen Bedingungen das Elutionsverhalten bekannter Hormone (Gastrin 1 - 17 und CCK) untersucht, um eine Vergleichs - möglichkeit zum Elutionsverhalten der unbekannten Substanz in den wässrigen Hirnextrakten zu erhalten.

2.2o. Überprüfung der Genauigkeit

Alle Hormonbestimmungen werden durch Dreifachansätze ermittelt. Es werden nur Werte verwendet, die eine relative Standardabweichung von weniger als 15 % bei der Auswertung ergeben.

3. Ergebnisse

3.1. Einfluß von Heparin auf den Eichkurvenverlauf

Der Einfluß des bei der Blutabnahme verwendeten Heparins auf die Immunreaktionen wurde durch Einsatz unterschiedlicher Heparinmengen in die Testansätze zur Erstellung der Eich - kurven geklärt.

Die Verläufe der Eichkurven bei heparinfreiem Inkubations - volumen und die Verläufe der Eichkurven bei Gab von 2o, 4o und 6o USP-Heparin-Teströhrchen zeigten keine Unterschiede.

3.2. Einfluß unterschiedlicher Mengen von verfallenem Frischplasma (BBP) auf den Eichkurvenverlauf

Bei der Bestimmung der CCK-8-Konzentrationen im Serum wurde der Einfluß von unterschiedlichen Mengen BBP auf den Eich - kurvenverlauf getestet. Es wurden Testansätze mit 0,1 ml, 0,2 ml und 0,3 ml BBP/2,5 ml Inkubationsvolumen hergestellt.

Gleiche Eichkurvenverläufe wurden sowohl bei BBP-freien Testansätzen wie bei Gabe von 0,1, 0,2 und 0,3 ml BBP/2,5 ml Inkubationsvolumen gesehen.

3.3. Eichkurvenverlauf bei verschiedenen Eiweißen in der Pufferlösung

Die Frage eines unterschiedlichen Eichkurvenverlaufs bei Gabe verschiedener Eiweiße in die Pufferlösung wurde durch Testansätze mit

Rinderserumalbumin	0,1 g%/0,02 m Veronal-Puffer pH 8,7
Ovalbumin	0,1 g%/0,02 m Veronal-Puffer pH 8,7
menschl.Serumalbumin	0,1 G%/0,02 m Veronal-Puffer pH 8,7

beantwortet. Unterschiede im Eichkurvenverlauf konnten in verschiedenen Testansätzen nicht festgestellt werden. Wegen der einfacheren Handhabung bei der Herstellung der Pufferlösung wurde mit Rinderserumalbumin gearbeitet.

3.4. Empfindlichkeit des CCK-8-Assays und Reproduzierbarkeit

Die Bindung an den Antikörper betrug bei einer Antikörper - verdünnung von 1:4oooo durchschnittlich 45 % der eingesetzten SHG-I-^{125}-Jodmenge. Die untere Nachweisgrenze des Assays lag bei 0,8 pg/ml (Bild 1). Meßpunkte von Eichkurven und Analysenproben wurden in Dreifachbestimmungen erstellt. Es ergab sich ein durchschnittlicher Variationskoeffizient in Serienbestimmungen von 7,5 %.

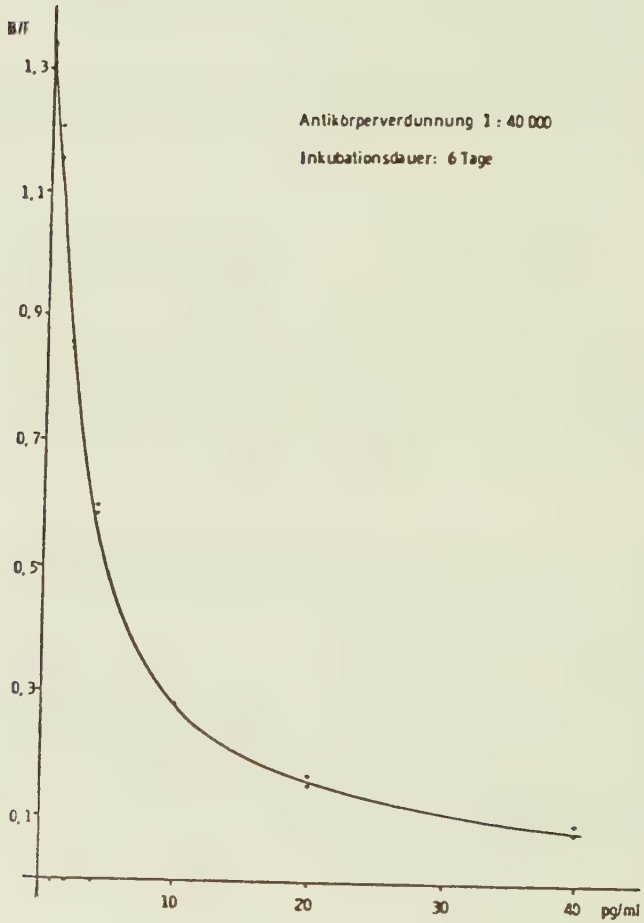

Bild 1

Eichkurve

Abszisse : pg Peptid (CCK - 8) / ml Inkubationsvolumen
Ordinate : B/F (Verhältnis antikörpergebundenes zu freiem Hormon)

3.5. Kreuzreaktionen mit Gastrin, gastrinähnlichen Hormonen und Hormonbruchstücken

Der Antikörper in dem benutzten Antiserum zeigte unterschiedliches Bindungsverhalten mit verschiedenen Hormonen und Hormonteilsequenzen. Diese unterschiedlichen Kreuzreaktionen wurden in mehreren Assays untersucht, wobei Hormone und Hormonbruchstücke eingesetzt wurden, die als Gemeinsamkeit das C-terminale Tetragastrin in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen. Die stärkste Kreuzreaktion bestand zwischen Gastrin 1 - 17 und dem C-terminalen Oktapeptid des CCK. Schwächer reagierten Gastrin 11 - 17, Gastrin 14 - 17 und Caerulein.

Aufgrund der Vermutung, daß es sich bei der in den Hirnproben vorhandenen Substanz um eine dem CCK-8-ähnliche handelt, wurden die Konzentrationsangaben entsprechend des im Assay angesetzten CCK-8 ausgewiesen (Bild 2).

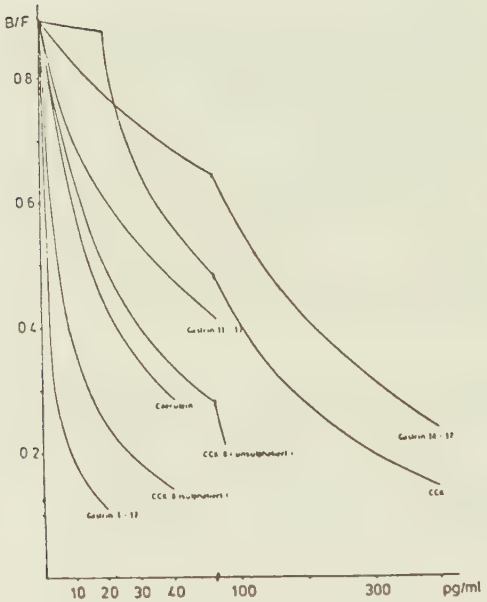

Bild: 2

Kreuzreaktion des benutzten Antiserums

Abszisse: pg Peptid bzw. Hormon/ml Inkubationsvolumen
Ordinate: B/F (Verhältnis antikörpergebundenes zu freiem Hormon)

3.6. Säulenchromatographie der wässrigen Hirnextrakte

Aufgrund der Kreuzreaktion des benutzten Antiserums wurden Säulenchromatographien der wässrigen Hirnextrakte durchgeführt. Zur Kennzeichnung der zu untersuchenden Substanz in den Hirnextrakten wurden säulenchromatographische Vergleiche mit bekannten Hormonen erhoben.

Bei der Auftrennung der wässrigen Hirnextrakte der Substantia grisea der Großhirnrinde, des Nucleus caudatus sowie des Putamens über eine Sephadex G-50 Fine-Säule, zeigte sich ein homogener Gipfel im Bereich um 100 %, bezogen auf das totale Volumen der Säule. Der im Assay verwandte CCK-8-Standard eluierte ebenfalls bei 100 %. Unter gleichen Bedingungen eluierten bekannte Hormone, Gastrin 1 - 17 bei 60-70 % und CCK bei 40 % des Säulen - volumens (Bild 3 und Bild 4).

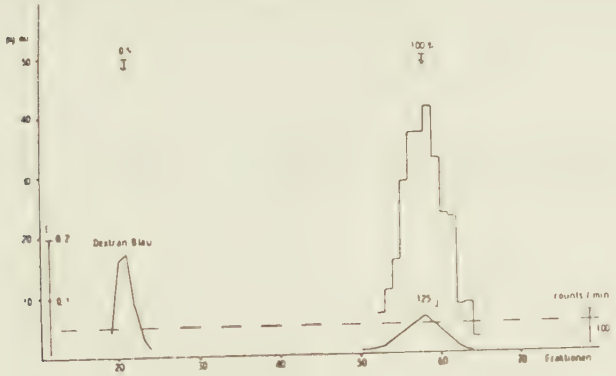

Bild 3

Säulenchromatographische Auftrennung über Sephadex G-50-Fine eines wässrigen Extraktes aus dem Nucl. caudatus des mensch - lichen Gehirns.

Abszisse: Röhrchennummer

Ordinate: pg CCK Oktapeptid / ml Fraktionsvolumen

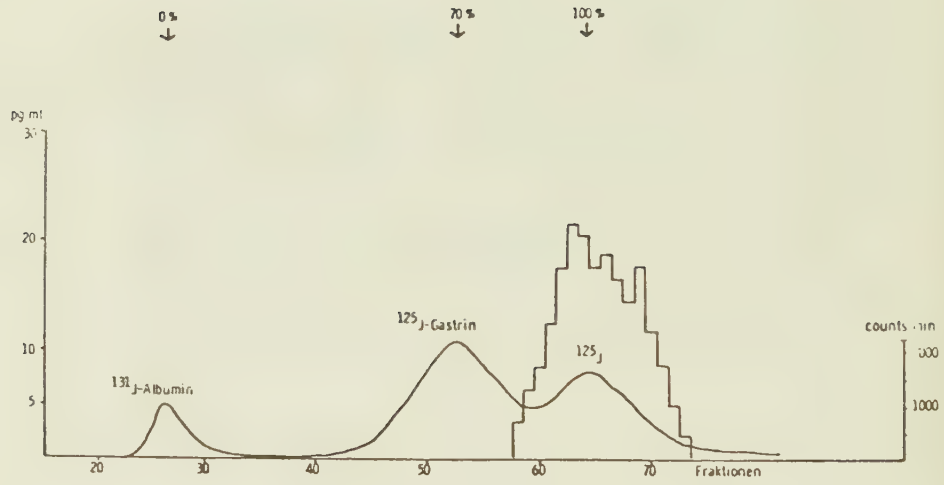

Bild: 4

Säulenchromatographische Auftrennung des CCK-Octapeptids über Sephadex G-50 Fine

Abszisse: Röhrchennummer
Ordinate: pg CCK-8/ml Fraktionsvolumen

3.7. Stärkegelelektrophorese der wässrigen Hirnextrakte

Um Anhaltspunkte über Ladung und Molekülgröße der unbekannten Substanz in den wässrigen Hirnextrakten zu erhalten, wurde die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld mit bekannten Hormonen und Hormonteilsequenzen verglichen.

Die zur Charakterisierung der Ladung und der Molekülgröße durchgeführte Elektrophorese der wässrigen Hirnextrakte zeigte eine eindeutige Immunreaktion zwischen dem 8. und 11. Segment des Stärkegelblocks. Das als Marker verwandte, bromphenolblau - gefärbte Albumin kennzeichnete das 3.-4. Segment. Freies Bromphenolblau markierte das 11. und 12. Segment.

Aufgetragenes CCK-8 zeigte gleiches Wanderungsverhalten wie die unbekannte Substanz in den wässrigen Hirnextrakten. Deutlich verschiedenes Wanderungsverhalten zeigten aufgrund ihrer gerin - geren Ladung kürzere Teilsequenzen des Gastrins (G 11-17 und G 14-17) und das nicht sulfatierte CCK Octapeptid. (Bild 5 und 6)

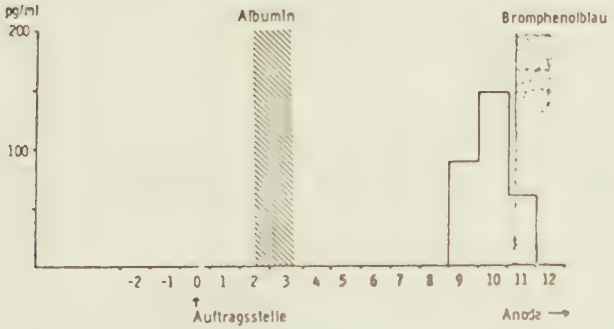

Bild: 5

Stärkegelelektrophorese eines wässrigen Extraktes aus der Subst. grisea des Parietallappens.

Abszisse: Segment Nr. a 1 cm
Ordinate: pg/ml Eluat

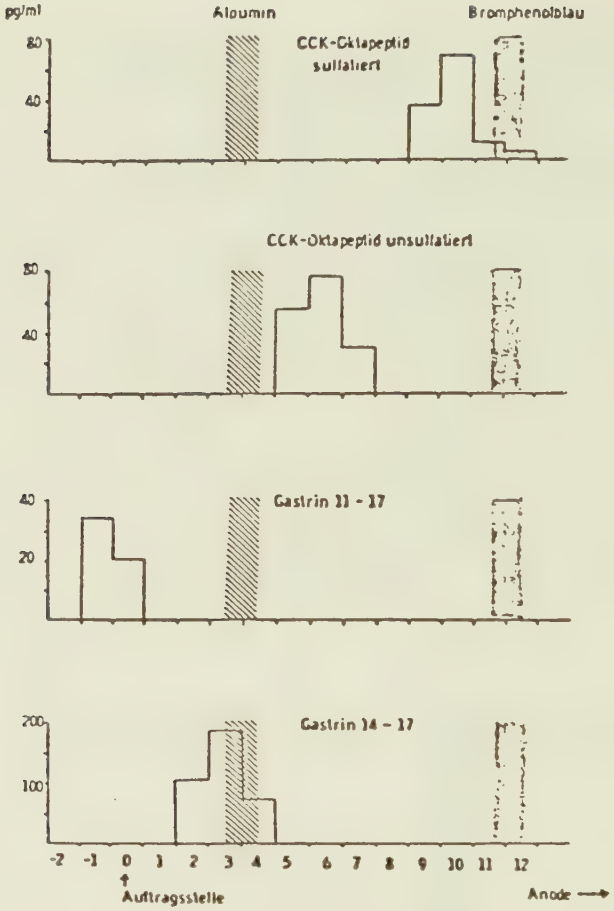

Bild: 6

Stärkegelelektrophorese verschiedener C-terminaler Teilsequenzen des Gastrins und des Cholecystokinins

Abszisse: Segment Nr. a 1 cm
Ordinate: pg/ml Eluat

3.8. CCK-8-Konzentration im menschlichen Serum nach Stimulation mit Olivenöl und Biloptin-Reizmahlzeit

Zur Bestimmung der CCK-8-Konzentrationen im menschlichen Serum wurden die Proben vor und nach Gabe von 100 ml Olivenöl via Duodenalsonde in den oberen Zwölffingerdarm im RIA untersucht. Ebenso wurden die CCk-8-Konzentrationen der Serumproben vor und nach peroraler Aufnahme der Biloptin-Reizmahlzeit im RIA ermittelt.

Bei den 3 Probanden handelte es sich um gesunde Männer im Alter zwischen 27 und 31 Jahren. Zwei hatten ein Idealgewicht, einer hatte ein Übergewicht von 10 %.

Beim Stimulationsversuch mit Olivenöl und bei der Gabe einer Biloptin-Reizmahlzeit konnte ein geringer Anstieg der CCK-8-Konzentration im Serum festgestellt werden.

Die Basalwerte lagen bei 40 pg/ml Serum. Beim Stimulations - versuch durch Gabe von Olivenöl, wie bei der Biloptin-Reiz - mahlzeit, konnte ein Anstieg der CCK-8-Konzentration im Serum auf 65 pg/ml nach 45 Minuten erreicht werden.

Tabelle: 2

Zeit	Proband I	Proband II	Proband III	
basal	45 pg/ml	42 pg/ml	38 pg/ml	Serum
5'	37 pg/ml	48 pg/ml	35 pg/ml	"
15'	55 pg/ml	56 pg/ml	55 pg/ml	"
25'	55 pg/ml	58 pg/ml	54 pg/ml	"
35'	60 pg/ml	58 pg/ml	61 pg/ml	"
45'	65 pg/ml	60 pg/ml	69 pg/ml	"
60'	40 pg/ml	60 pg/ml	58 pg/ml	"
90'	32 pg/ml	40 pg/ml	42 pg/ml	"

3.9. CCK-8-Konzentrationen im portalen und peripheren Hundeserum bei Olivenölstimulation

Der CCK-8-Gehalt der Hundeserumproben aus portalem und peripherem Blut wurde vor und nach Gabe von 200 ml Olivenöl ins Duodenum im RIA bestimmt.

Die basalen CCK-8-Konzentrationen im peripheren Hundeserum lagen bei 100 pg/ml. Ein Anstieg der Konzentration auf 160 pg/ml konnte nach 20 Minuten ermittelt werden.

Die basalen praehepatischen CCK-8-Konzentrationen lagen bei 80 pg/ml 10 Minuten nach Olivenölgabe zeigte sich ein Anstieg auf 116 pg/ml. Nach 20 Minuten betrug die CCK-8-Konzentration 205.

Tabelle: 3

Peripheres Hundeserum

Zeit	Hund I	Hund II	
basal	103 pg/ml	98 pg/ml	Serum
2'	113 pg/ml	120 pg/ml	Serum
5'	125 pg/ml	132 pg/ml	Serum
10'	154 pg/ml	13o pg/ml	Serum
15'	159 pg/ml	151 pg/ml	Serum
20'	163 pg/ml	160 pg/ml	Serum
30'	132 pg/ml	143 pg/ml	Serum

Praehepatisches Hundeserum

Zeit	Hund I	Hund II	
basal	84 pg/ml	79 pg/ml	Serum
2'	93 pg/ml	86 pg/ml	Serum
5'	110 pg/ml	108 pg/ml	Serum
10'	116 pg/ml	118 pg/ml	Serum
15'	172 pg/ml	168 pg/ml	Serum
20'	2o5 pg/ml	2o3 pg/ml	Serum
30'	144 pg/ml	173 pg/ml	Serum

3.10. CCK-8-Konzentration im Hundeliquor

Den nakotisierten Hunden wurde zeitlich, unabhängig von den Blutentnahmen,durch Suboccipitalpunktion Liquor entnommen. Die gewonnenen Proben enthielten eine CCK-8-Konzentration von 40 pg/ml Liquor.

3.11. CCK-8-Konzentrationen in den wässrigen Extrakten verschiedener Hirnregionen

Bei der Untersuchung der wässrigen Hirnextrakte zeigten höchste CCK-8-Konzentrationen die Proben der Substantia grisea der Großhirnrinde und des Nucleus caudatus.

Geringe Konzentrationen fanden sich in den Proben der Substantia alba der Großhirnrinde. Proben aus anderen Gebieten wie Globus pallidus, verschiedene Areale des Thalamus und Hypothalamus, des Corpus callosum, der Vierhügelplatte, der Crura cerebri, der Substantia nigra, des Nucleus ruber, der Pons, der grauen und der weißen Substanz des Kleinhirns und des Hirnstamms enthielten keinerlei Immunoreaktivität.

CCK - 8 - Konzentrationen in verschiedenen Hirnregionen
(Konzentrationsangaben in nanogramm/g Feuchtgewicht

	Gehirn 1	Gehirn 2	Gehirn 3	Gehirn
Temporallappen (subst.alba)	26,5	22,5	126,5	36,3
Temporallappen (subst.grisea)	64,0	328,0	387,0	138,5
Parietallappen (subst.alba)	18,5	13,7	28,7	6,7
Parietallappen (subst.grisea)	220,0	790,0	270,0	89,0
Frontallappen (subst.alba)	18,0	16,0	23,7	17,0
Frontallappen (subst.grisea)	198,0	272,0	199,0	160,0
Occipitallappen (subst.alba)	10,5	7,7	10,0	13,0
Occipitallappen (subst.grisea)	107,0	125,0	112,2	57,2
Globus pallidus	16,5	11,5	19,5	15,3
Nucleus caudatus	57,0	146,0	64,0	49,7
Kleinhirntonsillen	5,0	5,0	5,0	5,0
Cerebellum (subst.alba)	5,0	5,0	5,0	5,0
Pulvinar	5,0	5,0	5,0	5,0
Hypothalamus	5,0	5,0	5,0	5,0
Corpora mamillaria	5,0	5,0	5,0	5,0
Capsula interna	5,0	5,0	5,0	5,0
Corpus callosum	5,0	5,0	5,0	5,0
Subst. nigra	5,0	5,0	5,0	5,0
Colliculus sup.	5,0	5,0	5,0	5,0
Putamen	-/-	81,5	65,0	48,6
Vermis	5,0	5,0	5,0	5,0
Pons	5,0	5,0	5,0	5,0

Tabelle 1

4. Diskussion

4.1. Methodische Probleme des Radioimmunoassays

Unter Verwendung eines RIAs wurde eine dem CCK-8-ähnliche Substanz im menschlichen Gehirn nachgewiesen.

Neben dem Nachweis dieser Substanz wurden unterschiedliche Konzentrationen in anatomisch abgegrenzte Hirnregionen festgestellt. Das im RIA eingesetzte Antiserum enthielt Antikörper, die gegen das C-terminale Tetrapeptid des Gastrins gerichtet waren.

Das zur Immunisierung der Kaninchen verwandte Peptid (Gastrin 14-17) repräsentiert in seinem Molekül sowohl den biologisch aktiven Teil von Gastrin wie von Chole - cystokinin.

Aufgrund des niedrigen Molekulargewichtes und der damit verbundenen geringen antigenen Eigenschaft wurde Gastrin an Rinderserumalbumin gekoppelt (16, 18). Im RIA, bei Verwendung von Gastrin als Tracer, zeichnete sich das gewonnene Antiserum dadurch aus, daß das Immunogen - Tetragastrin - selbst am schwächsten kreuzreagierte. Mit zunehmender Verlängerung des Moleküls von Gastrin 11 - 17 bis zum Gastrin 1 - 17 zeigte sich eine Zunahme der Immunreaktivität.

Das C-terminale Oktapeptid reagierte ähnlich wie Gastrin 1 - 17, das nicht sulphatierte Oktapeptid deutlich schwächer. (Bild 2). Es ist anzunehmen, daß durch Kopplung von Tetra - gastrin an Rinderserumalbumin dieses in seiner sterischen Anordnung dem Gastrin ähnlicher als dem CCK wird.

Zur radioaktiven Markierung von Gastrin mit ^{125}-Jod wurde ein modifiziertes Verfahren nach GREENWOOD und HUNTER angewandt (22). Im Unterschied zu dem oben aufgeführten Verfahren wurde Natriumdisulfid unmittelbar nach Zugabe von Chloramin T dem Markierungsansatz zugefügt. Das so behandelte Reaktionsgemisch wurde anschließend sofort auf eine vorbereitete Sephadex G 50 Fine-Säule (Säulenvolumen 60 ml) aufgetragen (34).

Unter diesen Markierungsbedingungen wurden etwa 50 % der Gesamtradioaktivität auf das Gastrinmolekül übertragen. Gastrin ^{125}-Jod eluierte bei den gegebenen Versuchsbedin - gungen bei K_{av}0,6.

4.2. Konzentration und Verteilung einer CCK-8-ähnlichen Substanz im menschlichen Gehirn

In den letzten Jahren wurden durch radioimmunologische und immunohistochemische Untersuchungsverfahren Peptide im Gehirn, subzellulären Strukturen und in Körperflüssig - keiten verschiedener Spezies nachgewiesen, deren Vorkommen und Aktivität man ursprünglich dem Gastrointestinaltrakt zuordnete. Im Rahmen dieser Arbeit handelte es sich um den Nachweis einer, dem C-terminalen Oktapeptid des CCKs- ähnlichen Substanz im menschlichen Gehirn.

VANDERHAEGEN beschrieb die gefundene Substanz als gastrin - ähnlich (52). Er vermutete aufgrund säulenchromatographischer Untersuchungen dieser im Gehirn gefundenen Substanz ein niedrigeres Molekulargewicht. DOCKRAY berichtete in seinen Arbeiten von einer mehr dem Cholecystokinin-ähnlichen Substanz (9,10). MÜLLER (33) konnte in einem RIA für CCK dieses im Schweinehirn nachweisen. Mit Hilfe eines C-termi - nalen RIAs für Gastrin gelang dieses auch für das Oktapapeptid

des CCKs.

STRAUS (48) führte den immunohistologischen Nachweis des CCKs mit Hilfe der Peroxydasereaktion nach STERNBERGER in der Großhirnrinde beim Kaninchen. Wegen der vermuteten Spezies-Spezifität des CCKs konnte der Nachweis von CCK 1-33 nur im Schweinehirn gelingen (33).

BEINFELD (2) wies das Verhandensein einer CCK-ähnlichen Substanz in der Hypophyse bei Ratten nach. Die Konzentration dieser Substanz im Hypophysenhinterlappen zeige eine signifikante Abnahme bei physiologischen Störungen, die insbesondere eine Freisetzung von Vasopressin und Ozytocin hervorrufen. Weiterhin beschrieb er bei Ratten, daß nach Zerstörung hypothalamischer Strukturen durch stereotaktische Operationen die Konzentration der CCK-8-ähnlichen Substanz deutlich geringer als bei den Kontrollgruppen nachweisbar sei.

STRAUS und YALOW beschrieben niedrige CCK-Spiegel im Gehirn genetisch fetter Ratten (49). Ähnliche Ergebnisse konnten von anderen Arbeitsgruppen nicht erbracht werden (46,21)

4.3. CCK-8-Konzentrationen im menschlichen und im Hundeserum

Der Anstieg der CCK-8-Konzentration im peripheren Blut nach Stimulation mit Olivenöl und nach einer Biloptin-Reizmahlzeit bei den Probanden war gering. Ergebnisse anderer Autoren zu ähnlichen Versuchsanordnungen liegen nicht vor.

Die unterschiedliche Höhe der CCK-8-Konzentrationen im prae- und posthepatischen Blut beim Hundeversuch ist ungeklärt. Ein ähnliches Verhalten ist beim Pentagastrin bekannt, welches durch die Leberpassage rasch abgebaut wird.

Anfang der 70er-Jahre durchgeführte Versuche, die Veränderungen von Gastrinkonzentrationen bei Leber- bzw. Lungenpassagen beschrieben, gaben keine weiterführenden Hinweise (28,53,39,18). Weiterhin ist zu bedenken, ob und in welchem Umfang Narkose und operativer Eingriff störend auf die Versuchsergebnisse Einfluß nehmen.

4.4. Neuere Erkenntnisse über biologische Aktivitäten des CCKs

Neben den seit vielen Jahren bekannten biologischen Aktivitäten des Cholecystkinins wie Gallenblasenkontraktion, Reduktion des Sphincter Oddi Tonus und Steigerung der exkretorischen Leistung des Pankreas wurden in der letzten Zeit weitere, nicht auf das Intestinum beschränkte Wirkungen festgestellt (13,19,23,25,27,37).

GIBBS et al (14) untersuchte das Freßverhalten von Ratten mit einer Magenfistel nach Gabe von CCK. Nach intraperitonealer Gabe von wenig gereinigtem CCK kam es zu einer deutlichen Reduktion der Futteraufnahme. Zur Sicherung der Annahme, daß es sich hierbei tatsächlich um die Wirkung des CCKs handelte, wiederholte er die Versuche und verabreichte das synthetisch hergestellte C-terminale Oktapeptid des CCKs, welches die volle biologische Aktivität des gesamten Moleküls besitzt. GIBBS konnte durch CCK-8-Gabe gleiche Testergebnisse erzielen.

NEMEROFF zeigte mit seiner Arbeit, daß durch systematische Gabe und Injektion von CCK-8 in die Hirnventrikel stress-induziertes Fressen bei Ratten deutlich vermindert wird (36).

STURDEVANT und GOETZ untersuchten das Eßverhalten von Menschen

nach Gabe von wenig gereinigtem CCK. Sie stellten fest, daß eine schnelle intravenöse Gabe von CCK die Nahrungs - aufnahme deutlich reduziert; eine langsame Injektion eine Steigerung der Nahrungsaufnahme bewirkt (42).

Daß die Gabe von CCK zu Veränderungen der Aktivität des zentralen Nervensystems führt, zeigte DAFNY et al in Ihrer Arbeit. Nach Implantation von Elektroden im Ratten - hirn verglichen sie die Aktionspotentiale unter Normal - bedingungen und nach Injektion von CCK-8 in Zonen mit Appetitregulation. Sie legten dar, daß nach CCK-8-Gabe es zu einer systematischen Veränderung der Aktionspoten - tiale kommt (7).

PINGET, STRAUS und YALOW (38) beschrieben das Vorhandensein von cholecystokininähnlicher Immunreaktivität im subzellulären Raum. Der Nachweis konnte auch an den Synapsen peripherer Nervenendigungen bei Ratten und Kaninchen geführt werden.

In dieser Arbeit konnte mit Hilfe eines C-terminalen Gastrinassays eine dem CCK-8-ähnliche Substanz im menschlichen Gehirn nachgewiesen werden. Beim Vergleich der Ergebnisse anderer Untersuchungen mit den gefundenen Werten zeigt sich eine gute Übereinstimmung (3o,49,43,44)in Bezug auf die Höhe der CCK-8-Konzentrationen. Ein Nachweis der CCK-8-ähnlichen Substanz im menschlichen Gehirn war in der grauen und weißen Substanz, sowie in geringerer Konzentration im Putamen und im Nucleus caudatus möglich. Ein Nachweis in anderen Herinregionen, insbesondere in der Hypophyse, gelang nicht. Es ist zu bedenken, daß sich die Konzentrationsangaben sowie die Angaben über die Verteilung dieser Substanz im Gehirn in den Arbeiten anderer Autoren größtenteils auf tierexperimentelle Untersuchungen beziehen. Weiterhin wurde der Nachweis zum Teil unter

Verwendung von I^{125}-CCK als Tracer erbracht.

Es ist ungeklärt, ob das menschliche Untersuchungsmaterial durch das mögliche Vorhandensein tryptischer Enzyme in seiner Eiweißstruktur verändert wurde. Die Sektionen wurden frühestens 18 Stunden post mortem durchgeführt.

Über die Bedeutung und Funktion der CCK-8-ähnlichen Substanz im menschlichen Gehirn ist noch nichts bekannt. Die Frage, ob es sich hier möglicherweise um einen Neuro - transmitter oder einen Neuromodulator handeln könnte, ist unbeantwortet.

Durch die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse scheint es wenig wahrscheinlich, daß die Blutbahn als Übertragungsweg von Informationen zwischen Cerebrum und Gastrointestinaltrakt dient. Regelmechanismen zwischen Gehirn und Intestinum sind über hormonelle Einflüsse auf das Nervensystem vorstellbar.

Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen ist es weiterhin anzunehmen, daß dem CCK neben den bekannten Organwirkungen möglicherweise eine übergeordnete Regulation der Nahrungs - aufnahme bzw. der Nahrungsverwertung zukommt. Ob sich hieraus therapeutische Möglichkeiten in der Humanmedizin ableiten lassen, ist noch nicht zu übersehen. Die tier - experimentellen Erfolge bei der Behandlung der Fettsucht weisen auf diese Möglichkeit hin.

5. Zusammenfassung

Mit Hilfe eines Radioimmunoassays wurde im menschlichen Gehirn eine, dem C-terminalen Oktapeptid des Cholecysto - kinin ähnliche Substanz, nachgewiesen.

Nach Immunisierung von Kaninchen durch Gastrin I (14-17) wurde ein Antiserum gewonnen, das in einem RIA mit ^{125}-Jod-Gastrin als Tracerhormon eine hohe Affinität zu dem C-terminalen Oktapeptid des Cholecysokinins aufwies. Die Sicherung der Ähnlichkeit dieser Substanz mit dem C-terminalen Oktapeptid des CCKs wurde durch Bestimmungen in verschiedenen physikochemischen Systemen erbracht.

Höchste Immunoreaktivitäten ließen sich in der grauen Substanz des menschlichen Gehirns nachweisen. Geringere Aktivitäten zeigten die Gewebsproben der weißen Substanz, sowie das Untersuchungsmaterial des Putamens und des Nucleus caudatus. Die anderen menschlichen Hirnregionen zeigten keinerlei Immunoreaktivitäten.

Ein signifikanter Anstieg der Hormonkonzentrationen im Hunde- sowie im menschlichen Serum war mit Hilfe der durchgeführten Provokationstests nicht erreicht wurden. Die Funktion der nachgewiesenen Substanz, deren Vorhanden - sein und Wirkort ursprünglich auf das Intestinum beschränkt schien, im menschlichen Gehirn ist zu untersuchen.

Die mögliche Bedeutung der unterschiedlichen Konzentration in definierten menschlichen Hirnregionen ist ungeklärt.

6. Literaturverzeichnis

1. ANDREWS, P.

The gel-filtration behaviour of proreins related to their molecular weights over a wide range.
Biochem. J. 96, 595-6o6 (1965)

2. BEINFELD, M.C., MEYER, D.K.

Cholecystokinin-octapeptide in the rat hypothalamo - neuro-hypophysical system.
Nature Vol 288, 376-378 (11/198o)

3. BERSON, S.A., YALOW, R.S.

Assay of plasma insulin in human subjects by immuno - logical methodes.
Nature Vol 184, 1648 (1959)

4. BERSON, S.A., YALOW, R.S.

Radioimmunoassay in gastroenterology.
Gastroenterology Vol 62, No.5 (1972)

5. BLOOM, S.R.

Hormones in the gastrointestinal tract.
Br. Med. Bull , Vol 30 No.1, 62-67 (1974)

6. CHANG, M.M., LEEMAN, S.E., NIALL, H.D.

Amino-acid sequence of substance P
Nature New Biology 233, 86-172, July 1971

7. DAFNY, N., JACOB, R.M., JACOBSEN, E.D.

Gastrointestinal hormones and neural interaction within the central nervous system.
Experientia 31/6, 658-66o (1975)

8. DOCKRAY, G.J., GREGORY, R.A.

Does the C-terminal tetrapeptide of gastrin and CCK exists as an entity?
Nature Vol 286, 742 (8/198o)

9. DOCKRAY, G.J.

Immunochemical evidence of cholecystokinin-like peptides in brain.

Nature Vol. 264, 568-570 (1976)

10. DOCKRAY, G.J., GREGORY, R.A., HUTCHINSON, J.B.

Isolation, structure and biological activity of two cholecystokinin octopeptides from sheep brain.

Nature Vol. 274, 711-713 (1978)

11. ERSPAMER, V.G.

Pharmacological actions of caerulein.

Experientia 23, 702 (1967)

12. EULER, U.S.

Unidentified depressor substance in certain tissue extracts.

J. Physiol. 72, 74-87 June 1931

13. FEURLE, G.E.

Gastrointestinale Hormone.

Med. Klinik 121-124 (1979)

14. GIBBS, J., YOUNG, R.C., SMITH, G.P.

Cholecystokinin elicitis satiety in rats with open fistulas.

Nature Vol. 245, 323-334 (1o/1973)

15. GO, L.W., RYAN, R.J., SUMMERSKILL, W.M.

Radioimmunoassay of porcine cholecystokinin-pancreocymin.

J. Lab. Clin. Med. 684-689 (1971)

16. GOODFRIEND, Th.L., LEVINE, L. FASMAN, G.D.

Antibiodies to bradykinin and angiotensin, a use to carbodi-imides in immunology.

Science 144, 1344 (1964)

17. GRANATH, K.A.

Molecular weight distribution analysis by gel chromato - graphy on Sephadex.

J. Chromatog. 28, 69-81 (1967)

18. GUIGAN, Mc J.E.

Antibiodies to the carboxyl-terminal tetrapeptide of gastrin.

Gastroenterology 53, 697 (1967)

On antibiodies to gastrin: concerning their production, behavioural characteristics and uses.

Gut 11, 363 - 367 (197o)

Vitamines and hormones, advances in research and applications.

Academic Press New York (1974)

19. HARPER, A.A., RAPER, H.S.

Pancreocymin a stimulant of the secretion of pancreatic enzymes in extract of the small interstine.

J. Physiol. 1o2, 115-125 (1943)

2o. HARVEY, R.F., DOWSETT, L., HARTOG, M., READ, A.E.

Radioimmunoassay of cholecystokinin-pancreocymin.

Gut 15, 69o-699 (1974)

21. HO , P., HANSKY, J.

Cholecystokinin (CCK)-like peptide in gut and brain of normal and genetically obese mice.

Gastroenterology 76, 1155 (1979)

22. HUNTER, W.M., GREENWOOD, F.C.

Preparation of iodine ^{131}-labeled human growth hormone of high specific activity.

Nature 194, 495 - 496 (1962)

23. IVY, A.C., OLDBERG

A hormone mechanism for gallbladder contraction and evacuation.

Am. J. Physiol. 86, 599 (1928)

24. JORPES, E.

The isolation and chemistry of secretin and cholecystokinin.

Gastroenterology 55, 157 (1968)

25. JORPES, J.E., MUTT, V.

Clinical aspects of the gastrintestinal hormones secretin and cholecystokinin.
Scand. J. Gastroenterology 49-57 (1969)

26. KAMINSKI, D.L., RUWART, M.J., JELLINEK, M.

Structure-function relationships of peptide fragments of gastrin and cholecystokinin.
Physiologist 19, 247 (1976)

27. KATHER, M., SIMON, B.

Gastrointestinale Hormone in der Pathogenese der Fettsucht.
Deutsche Med. Wochenschrift 143-145 (198o)

28. KORMAN, M.G., HANSKY, J., RITCHIE, B.G.

Disappearance of gastrin across the lung.
AJEBAK 51, 679-687 (1973)

29. KUBES, L., JIRASEK, K.

Possible cellular localisation of cholecystokinin.
Experientia 30, 961-963 (1974)

30. LAMERS, C. et al

Immunological and biological studies on cholecystokinin in rat brain.
Am. J. of Physiol. 239 (3), 232-235 (9/198o)

31. LARSON, L.J., REHFELD, J.F.

Evidence for a common evolutionary origin of gastrin and cholecystokinin.
Nature Vol. 269, 335-338 (1977)

32. LARSON, L.J., REHFELD, J.F.

A peptide resembling COOH-terminal tetrapeptide amide of gastrin from a new gastrointestinal endocrine cell type.
Nature Vol. 277, 575-577 (1979)

33. MÜLLER, J.E., STRAUSS, E. YALOW, R.S.

Cholecystokinin and its COOH-terminal octapeptide in the pig brain.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 74, 3o35-3o37 (1977)

34. MÜLLER, J.E.

Ausarbeitung eines radioimmunologischen Bestimmungs - verfahrens zur Messung des Serumgastrinspiegels.
I. Med. Klinik Univers. Düsseldorf, Dissertation 1973

35. MÜLLER, H.E.

Gel-Filtration in der klinischen Diagnostik.
Med. Klinik 63, 125-128 (1968)

36. NEMEROFF, Ch.B., OSBAHR, A.J.

Cholecystokinin inhibits tail pinch-induced eating in rats.
Science Vol. 200, 793-794 (1978)

37. PEARSE, A.G.E.

Diffuse neuroendocrine system: peptides common to brain and intestine and their relationship to the APUD concept.
from: Hughes J.E.D., Centrally acting Peptides
Univ. Park Press Baltimore 49-55 (12/1978)

38. PINGET, M., STRAUSS, E., YALOW, R.S.

Localisation of cholecystokinin like immunoreactivity in isolated nerve terminals.
Proc. Natl. Acad. Sci., USA 6324-6325 (1978)

39. REEDER, D., BRANDT, E., WATSON, L.

Pre- and posthepatic measurements of mass of endogenous gastrin.
Surgery Vol. 72 No.1, 34-39 (1972)

4o. REHFELD, J.F.

Localisation of gastrin to neuro- and adenohypophysis.
Nature Vol. 271, 771-773 (1978)

41. REHFELD, J.F., LARSON, L.J.

Molecular form of gastrin and cholecystokinin.
Acta physiol. scand. 1o5, 117-119 (1979)

42. RICHARD, A.L., STURDEVANT, H.G.

Cholecystokinin both stimulates and inhibits human food intake.
Nature Vol. 261, 713-715 (1976)

43. ROBBERECHT, P., DESCHOLDT-LAUCKMAN, M.,VANDERHAEGEN,J.J.

Demonstration of biological activity of brain gastrin-like peptide material in the human: its relationship with the COOH-terminal octapeptide of cholecystokinin.

Proc. Natl. Acad. Sci: USA Vol. 75, 524-526 (1978)

44. SAITO et al

Cholecystokinin receptors in the brain: Characterization and distribution.

Science Vol. 2o8, 1155-1156 (6/198o)

45. SCHNEEMAN, B.O., LYMAN, R.L.

Distribution of cholecystokinin activity in the rat small interstine.

Digestion 15, 28-33 (1977)

46. SCHNEIDER, B.S., MONAKON, J.W., HIRSCH, J.

Brain cholecystokinin and nutrtinal status in rats and mice.

J. Clin.Invest. 64, 1348-1356 (1979)

47. STEWEN, W., STRAUSS, E., YALOW, R.S.

Further characterization of brain cholecystokinin converting enzymes.

Proct. Natl. Acad. Sci., USA Vol. 77 No.6, 3669-3671 (6/198o)

48. STRAUSS, E., MÜLLER, J.E., HO-SOON CHOI, YALOW, R.S.

Immunohistochemical localization in rabbit brain of a peptide resembling the COOH-terminal octapeptide of cholecystokinin.

Proct. Natl.Acad. Sci. USA Vol. 74, 3o33-3o34 (1977)

49. STRAUSS, E., YALOW, R.S.

Cholecystokinin in the brains of obese and non-obese mice.

Science 2o3, 68-69 (1979)

50. STRAUSS, E., YALOW, R.S.

Species specificity of cholecystokinin gut and brain of several mammalian species.

Proc.Natl.Acad.Sci. USA Vol. 75, 486-489 (1978)

51. STREMPLE, J.F., ABRAMOFF, P. VAN OSS, C.J., WILSON,ST. ELLISON, E.

Antibodies to synthetic human gastrin I.
The Lancet 1180-1182 (12/1967)

52. VANDERHAEGEN, J.J., SIGNENA, J.C., GREPTS, W.

New peptide in the vertebrate CNS-reacting with antigastrin bodies.
Nature 264, 568-570 (1976)

53. WYLLIE, J.M., STAGG, B.M., TEMPERLEY, J.M.

Inactivation of pentagastrin by the liver.
Br. J. Surg. Vol. 61, 22-26 (1974)

54. YALOW, R.S.

Application to problems of heterogenity of peptide hormones.
Pharmacological Reviews Vol. 25, No.2 (1973)
Radioimmunoassay of gastrin.
Gastroenterology Vol. 58, No.1 (1/1970)

55. YALOW, R.S., BERSON, S.A.

Problems of validation of radioimmunoassays.
J.B. Lippincott Company USA pp 374-4oo (1971)

56. YALOW, R.S., STRAUSS, E.

Heterogenity of gastrintestinal hormones.
Physiologie Inserm. Symposium No.3 Elsevier/North-Holland Biomed Press 82-92 (1977)

57. YAJIMA, H., YOSHIRO, M.

Synthesis of cholecystokinin-pancreocymin (CCK-PZ)
Chem. Pharm. Bull 1110-1113 (1976)

An dieser Stelle bedanke ich mich bei

Herrn Prof. Dr. Strohmeyer,

daß ich an seiner Klinik als Doktorand arbeiten durfte.

Dank gilt in gleichem Maße

Herrn Prof. Dr. Rick,

der mir die experimentellen Arbeiten in seinem Labor ermöglichte.

Für die Arbeiten im Pathologischen Institut sowie in der experimentellen Chirurgie danke ich

Herrn Prof. Dr. Meesen und
Herrn Prof. Dr. Arnold.

Die Erfahrungen und Kenntnisse auf dem Gebiet der Radio - immunologie verdanke ich

Herrn Prof. Dr. Fritsch.

Mit seiner Hilfe und Unterstützung gelang mir die Bewältigung von schwierigen Arbeitsabschnitten.

In besonderem Maße möchte ich mich bei

Herrn Dr. Müller

bedanken, der zu jeder Zeit mir bei Problemlösungen behilflich war.

Lebenslauf

Am 8. Dezember 1951 wurde ich als Sohn des Oberamtsrates Ernst Wolharn und seiner Ehefrau Hildegart Wolharn, geborene Stradtmann, in Coefeld/Westf. geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule und des Alexander-Hegius-Gymnasiums in Ahaus besuchte ich nach einem Umzug 1966 das Städtische Rethel-Gymnasium in Düsseldorf.

Nach dem Abitur am Rethel-Gymnasium 1972 und anschließender Militärzeit in Itzehoe und Düsseldorf begann ich im Wintersemester 1974 mein Medizinstudium an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster.

Nach einem Wechsel an die Universität Düsseldorf legte ich im Oktober 198o die ärztliche Prüfung ab.

Ab Januar 1981 arbeite ich als chirurgischer Assistenzarzt im Akademischen Lehrkrankenhaus der Universität Düsseldorf, Lukaskrankenhaus Neuss.